



TITULO: “UTILIZACIÓN DE SEMEN BOVINO SEXADO EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, TRANSFERENCIA EMBRIONARIA Y FERTILIZACIÓN IN VITRO”

RESUMEN

La utilización de semen sexado es una alternativa de gran impacto en las explotaciones pecuarias con mayor interés en los hatos lecheros, gracias a la técnica de la citometría de flujo permite separar los espermatozoides con el cromosoma X de Y siendo el primero en contener un 3.8 a 4% mas ADN cuyo resultado es aproximadamente el 90%, con seguridad determina el sexo hembra, de manera que nuestro interés es enfocar la importancia, ventajas y desventajas de la utilización del semen sexado aplicadas a las biotecnologías como Inseminación artificial, transferencia de embriones, y fertilización in vitro, siendo la Inseminación artificial que con mayor intensidad utiliza el semen sexado especialmente en vaquillas por presentar un mayor porcentaje de fertilidad comparado con vacas que ya han tenido un mayor recorrido en su historial



reproductivo, por su parte en transferencia de embriones y fertilización in vitro es reciente únicamente con fines investigativos, siendo oportuno conocer las virtudes de esta biotecnología puesta al servicio del manejo reproductivo pecuario

Palabras Claves: Semen sexado, citometría de flujo, inseminación artificial, transferencia embrionaria, fertilización in vitro, biotecnología.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
DEDICATORIA.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS:.....	13
a) General:.....	13
b) Específico:.....	13
REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1 ANTECEDENTES.....	14



2.1.1 RESEÑA HISTÓRICA.....	15
2.1.2 BIOLOGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	21
2.1.3 MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE	21
2.1.4 QUE ES EL SEMEN SEXADO BOVINO.....	27
2.1.5 IMPORTANCIA.....	29
2.1.6 VENTAJAS.....	32
2.1.7 DESVENTAJAS.....	37
2.1.8 PROCESO DEL SEXADO DE SEMEN.....	40
2.1.9 TÉCNICA DEL SEXADO DE SEMEN (CITOMETRÍA DE FLUJO).	40
2.2 ANÁLISIS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA.....	47
2.2.1 ANÁLISIS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA.	47
2.2.2 ANÁLISIS DE FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL.	52
2.2.3 ANÁLISIS DE INTEGRIDAD ACROSOMAL.....	53
2.2.4 UTILIZACIÓN DEL SEMEN SEXADO BOVINO EN PROGRAMAS DE INSEMINACION ARTIFICIAL.	55
2.3 IMPORTANCIA.....	55
2.4 VENTAJAS.....	57
2.4.1 DESVENTAJAS.....	61



2.4.2 Inseminación Artificial a Celo Detectado con Semen Sexado.....	66
2.4.3 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO CON SEMEN SEXADO (IATF).	71
2.4.4 CÁLCULO DE LOS BENEFICIOS Y COMPARACIONES.....	77
2.4.5 LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	80
2.4.6 Importancia	80
2.4.7 VENTAJAS.....	82
2.4.8 DESVENTAJAS.....	85
2.4.9 Utilización del semen sexado bovino en programas de transferencia embrionaria acorde a los últimos avances.	86
2.4.10 LA FERTILIZACIÓN IN VITRO CON SEMEN SEXADO ACORDE A ÚLTIMOS AVANCES.....	94
2.4.11 Importancia	94
2.4.12 Ventajas	96
2.4.13 Desventajas	98
2.4.14 Utilización de semen sexado en programas de fertilización in vitro con semen Sexado.....	100



CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	114
ANEXOS.....	124



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, **CAMILO ERNESTO URBINA QUITO**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Camilo Ernesto Urbina Quito
0104876248



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, **CAMILO ERNESTO URBINA QUITO**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación, son de exclusiva responsabilidad de su autor.

CAMILO ERNESTO URBINA QUITO

0104876248



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“UTILIZACIÓN DE SEMEN BOVINO SEXADO EN
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, TRANSFERENCIA
EMBRIONARIA Y FERTILIZACIÓN IN VITRO”**

**Monografía de grado, previa
a la obtención del título
de Médico
Veterinario.**

Autor: Camilo Ernesto Urbina Quito

Tutor: Dr. Carlos Soria. Msg

Cuenca - Ecuador

2012

Autor: Camilo Urbina Quito

Tema: “UTILIZACIÓN DE SEMEN BOVINO SEXADO EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL,
TRANSFERENCIA EMBRIONARIA Y FERTILIZACIÓN IN VITRO”



DEDICATORIA

Dedico la presente monografía a mis queridos padres quienes pusieron todo su esfuerzo y sacrificio para permitirme alcanzar con éxito una etapa más de mi vida estudiantil, a mis hermanos y en especial a Isabel por sus oportunas motivaciones, infinitamente agradecido con todos ellos para cumplir mi sueño de ser Médico Veterinario Zootecnista.

Infinitamente agradecido con Dios por brindarme la salud y fortaleza en los momentos más difíciles y saber enfrentarlos con mucha hombría.



INTRODUCCIÓN

En vista que en las ganaderías están utilizando semen sexado en programas de Inseminación artificial, con el objeto de incrementar la tasa en el número de hembras con relación a machos. Al estar en un mundo globalizado se debe tener conocimiento de los últimos avances en biotecnologías puestas a servicio de la ganadería. El sector pecuario de nuestro país al no contar con la suficiente disponibilidad de hembras bovinas de alta genética en los hatos ganaderos es necesario incorporar e implementar biotecnologías que brinden una mejor oportunidad al sector ganadero. La búsqueda por encontrar el mecanismo que permita conocer sexo de la descendencia se remonta a miles de años por científicos quienes crearon sus propias teorías y conclusiones, al transcurrir del tiempo ha permitido generar nuevos conocimientos encaminados a esdarecer la diferencia del sexo.



Mediante la aplicación de la técnica Citometría de flujo a partir del año 1980 se ha permitido diferenciar los espermatozoides por sus cromosomas sexuales X e Y en su contenido de DNA que ha permitido en la actualidad ser una herramienta útil al servicio de la reproducción animal. En el manejo reproductivo bovino con la aplicación de biotecnologías como, la inseminación artificial (IA) con la utilización de semen sexado acelera el mejoramiento genético anual por un aumento progresivo.

En explotaciones lecheras como las nuestras toma gran importancia para generar mayores ingresos económicos y obtener hembras que garanticen la reposición de vacas lecheras en los hatos a futuro. El control del sexo toma interés cuando se aplican en biotecnologías de reproducción asistida tales como la transferencia embrionaria (TE) y la fertilización *in vitro* (FIV).

Creemos que la utilización del semen sexado permite tener mayor posibilidad de nacimientos hembras en relación a



machos, por lo tanto mediante una recopilación bibliografía se dará un enfoque de esta biotecnología. La misión en la presente monografía es dar una visión general de la disciplina describiendo algunos de los últimos avances publicitados en biotecnologías de la reproducción como es el caso de la “Utilización de Semen Bovino Sexado en Inseminación Artificial, Transferencia Embrionaria y Fertilización in Vitro”.



OBJETIVOS:

a) General:

- Proporcionar una información actualizada de la utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro a fin de brindar un material de consulta a los interesados.

b) Específico:

- Describir el uso del semen sexado en programas de Inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro y las posibilidades de aplicación.



REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

La determinación del sexo es una interrogante con historia; desde siempre se ha querido saber cómo y por qué unos son machos y otras hembras. Hoy se sabe bastante, pero no se concluye aún en el conocimiento de algunos temas. Se sabe que al momento de la fecundación y luego de la unión de los pronúcleos masculinos y femeninos, queda indiscutiblemente determinado el sexo del nuevo individuo. El huevo o cigoto irá creciendo y desarrollando por sucesivas mitosis y mantendrá la información genética, adquirida en el momento de la fecundación, en todas sus células. (31)

2.1.1 RESEÑA HISTÓRICA.

Desde sus inicios el hombre busco la manera de satisfacer sus necesidades y la de sus semejantes, conjuntamente con la domesticación de los animales han permitido a las civilizaciones sobrevivir, gracias a los alimentos y subproductos de origen animal. Desde entonces y a partir de los años 8,000- 6,000 A.C. Comienza la cría de animales en la Mesopotámia con los ovinos principalmente, en Egipto con los bovinos y cabras, en la China con los caballos ponies, en Medio Oriente con los camellos y en Sudamérica las llamas y alpacas. (25)

Por su parte para la determinación del sexo de las especies se basaron por los conocimientos empíricos es decir, en creencias sin el respaldo científico que validen sus argumentos y teoría catalogados como Científicos, Folklóricos y Probabilidades, con una deficiente credibilidad en cuanto a sus resultados que carecían de fundamentos. (25)

Grafico 1. Antiguas hallazgos donde expresa la convivencia del hombre y los animales en el neolítico.



Fuente: [en línea].

<http://www.blogseitb.com/cienciayhumanismo/tag/domesticacion-animal/>

Hacia los años 460-370 A.C. Hipócrates es el primero en registrar interés en conocer el sexo en las crías, en conjunto con Anaxágoras en uno de sus estudios y teorías argumenta que los espermatozoides del testículo derecho producen machos y la izquierda hembra, que al sujetar uno de los testículos del otro permite determinar el sexo. Teoría que fue puesta en

práctica por los nobles franceses hasta el siglo XVIII.
(25)

En el año de 1780 Lazaro Spallanzani realiza la primera Inseminación Artificial (IA) en perras (22). En cambio en 1907 Ivanov logró iniciar la inseminación artificial en yeguas, vacas y ovejas, biotecnología que desde entonces ha servido de mucho en los programas de reproducción, en la actualidad ha tomado un mayor interés económico y se ha difundido alrededor del mundo siendo una de las primeras en consolidarse como una técnica de reproducción. (5)

En el año de 1910 Comienza la Inseminación Artificial en pequeña escala sin contar con buenos resultados hasta el año de 1950 el Semen Congelado empieza a sobresalir con mayor éxito. Hoy el 99% de la inseminación artificial en la industria lechera de USA y el Reino Unido usan semen congelado y se inseminan más del 65% de las vacas lecheras de USA, el 85%

del Reino Unido, y el 90% de Escandinava y Ecuador 1.5% (según el último censo Agropecuario). (5, 25).

El primer contador celular automático fue desarrollado por Moldavan (1934) y consistía en un tubo capilar por el que se hacían pasar células teñidas, el capilar estaba montado sobre un microscopio óptico con un objetivo sobre el cual había un detector fotoeléctrico que registraba el paso de células como un cambio en la luz que recibía, tenía inconvenientes con el grosor del capilar y obstrucción del mismo, dificultad que impide el mantenimiento de presiones. En el año de 1970 aparece la Citometría de Flujo y se desarrolla el primer equipo específico para separar los espermatozoides X de Y a gran velocidad (27). La citometría de flujo, desarrollada por el Dr. Lawrence Johnson consigna un 90 % de seguridad en el sexado del semen, toma base en las diferencias de ADN expuestas para el procesamiento del sexado de semen, siendo el más exitoso en la actualidad (22).



Es fácil darse cuenta entonces, que en los 80 o más años precedentes, los científicos han intentado afanosamente preseleccionar con seguridad el sexo de la progenie de sus animales. (1). Fines de 1980 se obtiene la separación de Espermatozoides X e Y (pero no son viables), por lo tanto no se obtuvieron los resultados esperados. (25)

A mediados de 1990 los resultados fueron alentadores, nace la primera ternera obtenida por inseminación artificial (IA), con la utilización de semen sexado en la Universidad del Estado de Colorado en EE.UU. (25)

A partir del año de 1992. El Método de La citometría de flujo fue patentado por el departamento de agricultura de los EE.UU para su empleo en el sexaje de los espermatozoides. (25)

Posterior ha este hecho importante en el año de 1998 nace la primera potranca del mundo por Inseminación Artificial utilizando semen sexado, fue producida por Fort Collins en Colorado, el servicio no estuvo

disponible comercialmente para criadores. En el año de 1999 nace la primera ternera nacida por IA con semen sexado congelado y un año mas tarde en el 2000 nace la primera ternera lechera utilizando semen sexado de la raza Pardo Suiza. Para el año 2001 nacen las primeras corderas igualmente con semen sexado en Sydney Australia, a bajas dosis con semen congelado. Ya en el año 2003 se obtuvo la primera cría nacida de padre y madre también obtenidos de semen sexado. (25)

En el transcurso del tiempo ha servido para corregir y brindar nuevos conocimientos dirigidos a la aplicación del semen sexado como una gran herramienta a disposición de los sistemas de reproducción en el ganado bovino. (5)

2.1.2 BIOLOGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES

El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para ejecutar como función única la fecundación del ovocito. (1)

Gametos masculinos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Son células alargadas consistentes con cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola que es el aparato necesario para la motilidad celular. (33)

2.1.3 MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE

Al inicio se da la espermatogénesis que incluye dos fases: a) la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermátides y b) la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados. (8)



La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval que contiene cromatina muy compacta. La cromatina consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico DNA y proteínas especiales llamadas protaminas espermáticas. Su número cromosómico y el contenido de DNA nuclear es haploide. (33)

La Cabeza se halla especializada para penetrar en el ovocito y liberar su carga genética. (1) La cabeza del espermatozoide es principalmente un núcleo cubierto en la parte anterior por el acrosoma (caperuza cefálica) y en la posterior por la membrana posnuclear. (1)

Acrosoma. Delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo y que se establece en las últimas etapas de la formación del espermatozoide. Esta estructura en forma de casquete, que contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas

participan en el proceso de la fecundación. Este recubre el extremo anterior del núcleo espermático. (33)

Cola. Formado por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. (33)

La cola contiene la organización metabólica para producir energía y proporciona el mecanismo impulsor para la movilidad de la célula espermática. (1)

La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola comprende el axonema. El axonema se compone de nueve pares de micro túbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un padrón helicoidal alrededor de las

fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática. (33)

El segmento principal, que continua en sentido posterior desde el anillo citoplasmático y se extiende casi hasta la punta de la cola, esta formado por axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. La vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola. (33) El segmento caudal, posterior a la determinación de la vaina fibrosa, contiene solo el axonema central cubierto por la membrana plasmática. El axonema es el que le da la motilidad al espermatozoide. Los pares externos de micro túbulos del patrón 9 más 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes. (33)

Grafico 2. Observación de espermatozoides bovinos mediante tinción.



Fuente: [en línea].

<http://fisicabiologicaivet.wordpress.com/2010/10/16/espermatozoide-bovino-tincion-eosina-nigrosina/>

Esta estructura contiene el material genético necesario para fertilizar el ovulo (fecundación) y transmitir a la cría ciertas características que hacen que los hijos se parezcan a los padres. (3)

Los conocimientos de la fisiología del espermatozoide en el aparato genital femenino restringen la utilidad de las mediciones de las características seminales in vitro, lo cual es particularmente cierto en cuanto se



refiere a las medidas de la actividad metabólica. Uno de los primeros descubrimientos decisivos de la influencia del medio femenino sobre la función del espermatozoide se refiere al fenómeno de la capacitación de la célula espermática. Se han encontrado concentraciones elevadas de glicerilfosforilcolina en el semen de carneros, toros, caballos, sementales, cabras, conejos y hombre. (1)

Los espermatozoides no pueden metabolizar este abundante substrato seminal in vitro, pero se ha identificado actividad de diesterasa de glicerilfosforilcolina en el líquido procedente de los lavados uterinos de la oveja, vaca, cerda, rata y ratón.

Los productos de la hidrólisis uterina, glicerol y fosfoglicerol, podrían actuar como fuentes de energía al ingresar en la vía glucolítica. La actividad de la diesterasaglicerilfosforilcolina uterina es regulada por esteroides ováricos y es mayor cuando son elevadas las concentraciones de estrógeno. (1)



2.1.4 QUE ES EL SEMEN SEXADO BOVINO.

El semen sexado es el resultado obtenido por un proceso que se denomina citometría de flujo; este es el único sistema actualmente probado, autorizado y eficaz en la obtención de semen sexado que pueda ser posteriormente utilizado para inseminar vacas; existen otros con un grado de eficacia un poco mayor como el PCR pero que destruyen el semen. En el caso de los mamíferos los gametos masculinos, los espermatozoides, son los responsables del sexo de la cría. En la división de los cromosomas que se produce en la formación de los espermatozoides, unos transportan el cromosoma sexual X y otros el Y. Los óvulos de las vacas son todos X. Si el espermatozoide que se une al óvulo es X dará lugar a una ternera, y si es Y a un ternero. Las diferencias en la cantidad de ADN de los espermatozoides X e Y es lo que posibilita su separación. Los espermatozoides X tienen un 3,8 % más de ADN que los espermatozoides Y. (28)



Cada dosis obtenida de semen sexado contiene al menos un 90% de espermatozoides del sexo elegido, es decir, de cada 100 partos al menos 90 serán del sexo elegido pero hay que tener en cuenta que todavía podemos tener un máximo de 10 nacimientos del sexo no deseado. Las dosis de semen sexado no contienen espermatozoides muertos o anómalos ya que estos espermatozoides no se tiñen y por lo tanto no se separan. (13, 26)

Sin embargo, comparado al semen convencional, se ha reportado una baja fertilidad debido principalmente a la baja eficiencia de la selección espermática mediante el método de flujo citométrico, siendo la concentración espermática de semen sexado de 2,1 millones de espermatozoides, mientras que el semen convencional tiene una dosis de 15 a 20 millones de espermatozoides. (13)

2.1.5 IMPORTANCIA

El sexado del semen es una tecnología de creciente utilización e interés en los programas de inseminación artificial (IA) del ganado bovino. Sus efectos sobre la tasa de parición de hembras beneficia enormemente a los hatos en donde la ausencia de hembras de reemplazo es evidente, por lo tanto modificarían positivamente el porcentaje de reposición en los hatos desplazando la presencia de machos lo que permite incrementar los márgenes de utilidades que benefician enormemente a las ganaderías. (18)

Son inmensos los beneficios que traería tanto para el sector lechero como para el ganado de ceba. En el ganado bovino lechero, las vacas con mayor mérito genético se podrían destinar a la producción de crías hembras y el resto de las hembras a generar crías macho usando una raza de carne.

Los productores de carne podrán inseminar sus mejores vacas para reposición, que paran hembras, esto permitirá mejorar mucho la facilidad de partos ya



que en general una hembra pesa menos al nacimiento que un ternero macho. (26)

Desde el momento en que seleccionó esas madres para generar el reemplazo por su calidad genética, las hijas serían naturalmente las madres perfectas de la siguiente generación de reemplazos y del resto del rodeo se obtendrían preferentemente crías macho para el mercado.

En los programas genéticos aumentaría la respuesta en la tasa de selección, pues los ganaderos producirán más toros con un número reducido de vacas elite. (24)

El sexaje de espermatozoides tiene un valor económico de gran interés en la cría de animales con idoneidad para la producción de carne o leche y en sistemas en los que la productividad se ve favorecida por la progenie de un sexo. Existe una demanda de mercado de selección de tecnología espermatozoides del sexo seleccionado, tecnología que se puede



insertar en industria de la producción de semen congelado. (16).

Una de las demandas más grandes en la producción bovina actual es la de poder controlar el sexo de la cría. En general, la producción bovina se ve favorecida con la producción de terneras y solo en contadas ocasiones son económicamente rentables los terneros (machos). (17)

Grafico 3. Catálogos para la venta de semen sexado de bovinos de leche.



Grafico 4. Hembras bovinas disponibles para programas de inseminación con semen sexado.



Fuente: [en línea].

http://www.ayrshirecolombia.com.co/catalogo_toros.html

- En congelación de estos espermatozoides es diferente al utilizado normalmente; no utiliza glicerol por lo que es un método menos agresivo para las células espermáticas que permite obtener un 80% de motilidad tras la descongelación; de esta forma se necesita congelar menos espermatozoides en cada dosis para inseminar las vacas. (24)



- Los toros jóvenes podrían ser probados más temprano por la preponderancia del número de hijas en sus progenies. (24)
- Una porción de vacas lecheras, las no escogidas para la producción de reemplazos lecheros, podrían dedicarse a otros objetivos, por ejemplo a la producción de carne (cruze con toros de razas de carne).
- Las vaquillonas sobrantes, tras el reemplazo habitual, podrían convertirse en receptoras de embriones de calidad genética superior.
- Se obtiene un Mayor número de terneras y menos problemas de parto
- Mayor número de novillas por preñez



- Mayor producción láctea
- Mayor reposición en novillas
- Menos gasto veterinario
- Menor intervalo “vaca vacía”
- Mayor ganancia por más lactancias. (24)

Bioseguridad

- Expandir explotación con reemplazos propios (25)
- Reducir las posibilidades de introducir enfermedades graves y costosas
- Mejorar la calidad de la leche

- Eficiencia y ganancia económica del progreso genético:
- Seleccionar línea sanguínea específica (25)
- Obtener crías hembras de vacas de mayor potencial genético
- Mayor porcentaje de rechazo de vacas menos productivas (más presión de selección por más disponibilidad de novillas)
- Venta de novillas preñadas con fetos hembras
- Más hembras totales y menos machos no deseados
- Usar semen de razas de carne en vacas lecheras inferiores sin comprometer la reposición, o convertirlas en receptoras de embriones.

- Eficiencia y ganancia económica del progreso genético:
- Más vientres para pruebas de progenie en toros jóvenes
- En programas de TE y FIV, menos costo y tiempo de producción.
- Más hembras obtenidas (en FIV y TE). (25)

2.1.7 DESVENTAJAS.

No hay semen sexado de todos los toros

- El porcentaje de hembras esperado oscila en el 85% a 90%
- Uso exclusivo en novillas vírgenes, con celo natural evidente, y no en vacas

- Implica perfecto manejo del semen y la IA para obtener buenos resultados. Condiciones y técnica de descongelado son determinantes en el resultado del programa de inseminación.
- Uso sólo en explotaciones bien manejadas, donde las novillas alcancen más del 60 % de su peso adulto a los 14 meses de edad, y estén en buenas condiciones de salud.
- Aumento de oferta de novillas disminuirá valor individual de venta. (25)
- La separación de espermatozoides (X o Y) presenta un 10% de sexo no deseado.
- En la producción de las dosis sexadas se produce una alta dilución que puede conducir a la pérdida permanente de la motilidad, de la

actividad metabólica y capacidad fertilizante por el estrés ocasionado por la técnica de sexado.

- La eliminación del plasma seminal desestabiliza la membrana, dificultando la capacitación funcional.
- Los espermatozoides pueden fertilizar inmediatamente in vivo o in vitro, pero también morir prematuramente al depositar lejos del sitio de fertilización (in vivo), o si se mantienen a altas temperaturas (in vitro). (25)
- Cada máquina cuesta 280 mil dólares (aprox.) para trabajar a escala comercial.
- El precio de la dosis semen sexado es mayor al semen convencional.

- Incremento en Número de reemplazos implica menos recursos forrajeros para producción de leche y mayor inversión en mano de obra.
- Presión de selección intensa puede disminuir la variabilidad genética de la población, y ésta podría aumentar la consanguinidad. (25)

2.1.8 PROCESO DEL SEXADO DE SEMEN

2.1.9 TÉCNICA DEL SEXADO DE SEMEN (CITOMETRÍA DE FLUJO).

La citometría de flujo como técnica de sexado de semen, permite la separación de los espermatozoides X de Y en base a su contenido de ADN. La calidad y concentración espermática de los eyaculados son



quizás los factores más importantes para obtener una buena separación de las dos poblaciones espermáticas. (22, 26)

Para considerar a un toro como apto desde el punto de vista reproductivo, asumiendo que es un animal clínicamente sano, este debe cumplir con tres requisitos básicos: buena libido, buen estado clínico reproductivo y buena calidad espermática. (20)

Así lo demuestran resultados que indican una alta correlación entre la motilidad espermática, la concentración y la separación de las poblaciones en un citómetro de flujo de alta velocidad. Por ende, la separación de espermatozoides X e Y se lleva a cabo normalmente en eyaculados con más del 50% de espermatozoides con motilidad progresiva y 75% de espermatozoides normales. El semen se incubaba con un colorante que tiñe el ADN de los espermatozoides (Hoechst 33342), el cual tiene la particularidad de

emitir una fluorescencia cuando es sometido a la luz láser. (23)

A mayor cantidad de ADN (espermatozoides con cromosoma X), mayor fluorescencia. Para poder detectar la diferencia de fluorescencia y separar los espermatozoides deseados, se utiliza un citómetro de flujo. El mismo consiste en un circuito cerrado de alta velocidad de flujo de líquidos que permite alinear y “leer” los espermatozoides individualmente en microgotas.

La fluorescencia que produce cada espermatozoide teñido es procesada por un software que permite al operador seleccionar la población espermática con mínima o máxima luminosidad, según el sexo que se quiera separar. (22)

Los espermatozoides elegidos son cargados eléctricamente, desviados del flujo original en un campo magnético y finalmente recolectados en un



tubo para su posterior congelación. Aproximadamente del 100% de los espermatozoides, un 20% termina colectado en la fracción X, y un 20% en la fracción Y; el 60% restante lo constituyen espermatozoides que no pudieron ser detectados por la técnica, espermatozoides muertos y gotas sin esperma. (14)

Adicionalmente se añade otro colorante, yoduro de propidio (PI) que permite determinar los espermatozoides muertos o dañados y de esta manera separarlos de los espermatozoides sexados y viables. (17)

Grafico 5. Proceso de clasificación de los espermatozoides mediante la citometría de flujo



Fuente:

[Internet].<http://jairoserrano.com/2009/02/usando-semen-sexado/>

Finalmente se somete a un proceso de congelación.
El semen sexado se presenta comercialmente

congelado, en pajuelas de 0,25 ml. Las mismas contienen 2 ó 10 (millones) espermatozoides. La dosis menor se utiliza normalmente en IA y FIV y la mayor en TE. La velocidad de separación que se utiliza actualmente permite obtener 7 pajuelas de 2 (millones) espermatozoides X e igual número de Y por hora. (23)

Grafico 6. Almacenado del semen sexado en pajillas de 0,25 ml



Fuente:

[Internet].http://www.minitube.de/DE_esl/Productos-y-Servicios/Congelacion-de-Semen

Para controlar la calidad del semen, se descongela una pajuela por partida y se evalúa la motilidad progresiva y la pureza (proporción del sexo deseado) de las dosis producidas. Las mismas deben tener un mínimo de 35% de espermatozoides con motilidad progresiva y 85% de certeza del sexo para alcanzar los estándares de aprobación. (23)

Grafico 7. Crioconservación del semen en termos con nitrógeno liquido.



Fuente: [Internet].

http://190.34.208.123/MIDA/index.php?option=com_content&view=article&id=1774:ganaderos-de-boquete-

inician-seminario-sobre-inseminacion-artificial-en-bovinos&catid=183:octubre-2012

2.2 ANÁLISIS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA

2.2.1 ANÁLISIS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA.

Los signos clínicos varían según la edad del animal y la especie y cepa del parásito. La mayoría de los casos de babesiosis se observan en adultos, y los animales menores de 9 meses generalmente no presentan síntomas, y en condiciones naturales, transcurre un largo lapso entre la picadura de las garrapatas infectantes y la aparición de los signos clínicos, durante ese intervalo, los animales no muestran ninguna manifestación patológica. La destrucción de glóbulos rojos y la liberación de hemoglobina y sustancias tóxicas provocan fiebre, hemoglobinuria, anemia e ictericia, la cuenta de

eritrocitos puede descender a 1 ó 2 millones de eritrocitos por mm^3 de sangre. La hemoglobinuria y la ictericia se presentan por la destrucción de eritrocitos. Se ha considerado que los signos clínicos de anemia no son los responsables de la muerte, sino que probablemente sea que metabolitos del parásito provoquen la activación de mecanismos fisiológicos que reducen a una inflamación generalizada, shock y muerte del animal (1, 17).

El estudio se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables. (21)



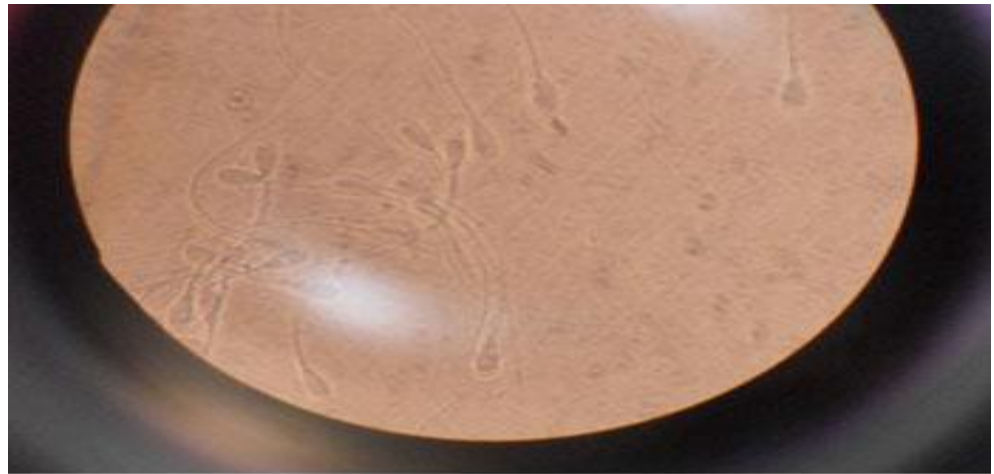
Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el Ioduro de propidio (PI). Este compuesto entra en espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. (21)

Otro fluorocromo ampliamente utilizado para identificar espermatozoides vivos es el SYBR-14, que es capaz de atravesar membranas intactas y de unirse al ADN de los espermatozoides. Presenta algunas ventajas con respecto a los fluorocromos basados en la actividad esterasa intracelular: es una molécula más estable, no tiene que sufrir una transformación enzimática para poder actuar, y se une específicamente al ADN del espermatozoide, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material genético no se va a marcar, y por tanto quedará descartada del análisis. (21)

El SYBR-14 suele utilizarse en combinación con PI, y de esta forma se pueden distinguir dos poblaciones espermáticas: una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al PI, y por tanto emiten fluorescencia roja; y la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al PI pero dejan entrar el SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde. (21)

Con respecto a la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales hay discrepancia entre los autores. Decuadro y col. (2002) y Christensen y col. (2004) hablan de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis, siempre que se respete una concentración espermática mínima por pajuela. Sin embargo la viabilidad espermática apenas se correlacionaba con la fertilidad. (21)

Grafico 8. Observación de la motilidad de los espermatozoides.



Fuente:

[Internet].http://www.crbareco.com.ar/servicios_congelacion.php

2.2.2ANÁLISIS DE FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

Para evaluar la funcionalidad mitocondrial se utiliza el fluorocromo Rodamina 123, este penetra en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior.

Al incidir la luz del láser sobre espermatozoides teñidos con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia verde. (21)

La Rodamina 123 suele utilizarse en combinación con PI, que tiñe de rojo el núcleo de los espermatozoides degenerados y por tanto sin actividad mitocondrial. Aunque la Rodamina 123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células. Evaluando dosis de semen bovino congelado, Gillan y col. observaron una elevada correlación entre el porcentaje de

espermatozoides positivos a Rodamina 123 y el porcentaje de espermatozoides positivos a SYBR-14, lo que indica que los espermatozoides vivos tienen funcionalidad mitocondrial. (21)

2.2.3ANÁLISIS DE INTEGRIDAD ACROSOMAL.

La integridad acrosomal puede ser valorada por el uso de una lectina conjugada con un fluorocromo. Las lectinas más utilizadas son la PNA (peanutagglutinin), que se une específicamente a la membrana acrosomal interna de los espermatozoides, y la PSA (pisumsativumagglutinin), que se une a la matriz acrosomal y a la membrana acrosomal externa. (18)

El uso de lectinas conjugadas con un fluorocromo, como la fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE),

permite detectar aquellos espermatozoides que tienen la membrana acrosomal dañada, lo cual posibilita el paso de la lectina, y por tanto del fluorógeno, al interior del compartimento acrosomal. Al aplicar el análisis con citometría de flujo, es más común el uso de espermatozoides vivos no permeabilizados, y por tanto la lectina detectará los acrosomas dañados. Otra posibilidad para identificar la presencia de alteraciones acrosomales es el uso de anticuerpos monoclonales, marcados con un fluorocromo, frente a moléculas específicas del contenido acrosomal. (21)

Durante las primeras horas tras la descongelación de las muestras, los espermatozoides vivos apenas tienen el acrosoma dañado, es decir, la segunda población espermática está ausente, sin embargo, esta población puede aparecer tras varias horas de incubación a 37°C. Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la integridad acrosomal y la capacidad fecundante de los espermatozoides. (9, 21)



2.2.4 UTILIZACIÓN DEL SEMEN SEXADO BOVINO EN PROGRAMAS DE INSEMINACION ARTIFICIAL.

2.3 IMPORTANCIA

Algunas importantes aclaraciones antes de la creación de un programa de inseminación artificial, existe la posibilidad de producir un ternero por vaca por año con sexo definido, utilizando la inseminación artificial. Por lo que permite estar cerca del intervalo entre partos de 12 meses, el período de servicio entre 70 y 80 días y de diseñar el comienzo de la temporada de cría. Es posible obtener una alta eficiencia reproductiva asociada con programas de mejora genética que emplean la inseminación artificial con semen sexado la cual permite tener mayores posibilidades de concebir hembras por cada servicio

en un mismo periodo de tiempo, que al final permite tener un rebaño homogéneo, con animales del sexo esperado y genéticamente superiores. Además generar mayores posibilidades económicas con el uso de esta tecnología. (14)

En primera instancia, la inseminación artificial por ser la metodología de trabajo más habitual relacionada con el semen sexado, se analizará la información referida a inseminaciones efectuadas sobre celo detectado, y también se abordan trabajos recientes donde se ha empleado semen sexado en programas de inseminación a tiempo fijo (IATF), sin la necesidad de la detección del celo. (22)

Grafico 9. Criaderos de bovinos obtenidos con semen sexado



Fuente: [Internet].

<http://fuentesfidedignas.com.mx/portal/index.php/notas/1671-la-sagarpa-entrega-apoyos-a-pecuarios>

2.4 VENTAJAS

Existe mayor predisposición de hacer uso del semen sexado en vaquillas primerizas por los niveles de fertilidad que presenta al iniciar su vida reproductiva.

- Menos problemas de distocia, ya que las terneras al nacer tienen un promedio de peso al nacer 5 libras menos que los terneros machos,

siendo los causantes de problemas de distocia. Sucede cuando las novillas tienen su primera cría. (14)

- El valor genético de las vacas de un año serán más altos en promedio de las vacas más viejas, así que son ideales para la producción de sustitutos. (14)
- Hay menos vacas viejas, y al contrario habrá mayor número de crías de reemplazo, y por lo tanto puede ser cruzado con toros óptimos para producir becerros más valiosos para la venta al destete. (14)
- El semen sexado es apropiado, como por ejemplo para la producción de terneros del club, cada uno encargado del hato tendrá que decidir si, y donde el semen sexado se adapte a su programa. (14)



- Aumentar el porcentaje de terneras para ampliar la manada o vender reemplazos. (14)
- El Semen sexado con cerca del 90% de precisión en gran medida obtendremos una hembra.
- El programa permite la expansión del hato rápidamente sin el riesgo de introducir enfermedades que ocurren con los animales adquiridos.
- Es ideal para producir novillas preñadas para la venta
- El aumento de la intensidad de selección, eligiendo las crías genéticamente superiores de los reemplazos.

En Bovinos de Carne:

- Aumenta el porcentaje de terneros para la producción de carne. Son más valiosos que las



vaquillas porque los machos son más grandes y crecen de manera más eficiente. (14)

- Aumenta el porcentaje de terneros con fines de pie de cría. (9). La eficiencia económica de utilizar esta tecnología en la producción de ganado ciertamente depende del número de los terneros producidos por la reducción con un esperma menos fértil. (19)
- Obviamente para la aplicación de semen sexado en la IA se debe tener los conocimientos necesarios como el hecho de explicar la deposición del semen cerca del lugar de la fecundación, el momento de la ovulación, en realidad puede estar en relación dirigida al aumento en las tasas de preñes. Sin embargo se necesita más investigación para dilucidar estas cuestiones. (19)

- Grafico 10. Disponibilidad de un mayor número de hembras con el uso del semen sexado



Fuente: [Internet].

<http://www.tvpacifico.com.mx/news/noticia-display.php?nota=94621>

2.4.1 DESVENTAJAS.

- La fertilidad del toro, la concentración de la dosis de inseminación, la precisión y el tiempo en la detección del celo y la habilidad del inseminador

disminuyen la tasa de fertilidad del semen sexado. (19)

- En un estudio, la inseminación con baja concentración de espermatozoides (2 millones) resultó en tasas de preñes más bajas en comparación con una concentración de 15 millones de espermatozoides por dosis, con un semen no sexado. (19)
- La razón específica para la fertilidad más baja de semen sexado no se conoce, pero algunos de los recursos utilizados en el procesamiento son posibles responsables de la calidad inferior del semen, tal como la exposición al láser UV, los efectos reales de la dilución del semen, la presión y la carga eléctrica. (19)
- La variación en la fertilidad del semen también puede estar influenciada por las diferencias individuales en la fertilidad de los toros. Y la concentración de la dosis de semen. Aunque la

comparación de semen de toros y diferentes concentraciones por dosis presentan otras variables no estudiadas. (16)

- En la mayoría de las circunstancias, establecer la precisión superior al 90% es demasiado caro, que nos lleva a otra limitación que presenta un 10 % de nacimientos con sexo no deseado. (14)
- Para fines comerciales los gastos del equipo clasificador de 2-boquillas (como un motor de 2 cilindros) cuesta alrededor de medio millón de dólares. (14)
- El costo del semen sexado por lo general tiene un precio mayor a la dosis de semen normal, para mantener los costos manejables, menos espermatozoides se empaquetan por dosis de semen sexado. (14)



- Otra limitación, el semen sexado no está disponible para todos los toros por algunas razones, en su mayoría relacionados con la oferta y la demanda, pero en ocasiones el procedimiento de determinación del sexo simplemente no funciona bien para un toro en particular. (9)
- Los espermatozoides no sobreviven bien al realizar el sexado, descongelado, y recongelado. (14)
- La fertilidad del semen sexado es menor que la del semen convencional, en parte debido al menor número de espermatozoides por dosis de inseminación y en parte por la presión sobre los espermatozoides desde el proceso de determinación del sexo. (14)

- Bajo circunstancias ideales, las tasas de preñez son deficientes y puede estar dentro del 10% de las tasas de preñez con semen sexado. Sin embargo, de manejar en lo correcto los hatos, las tasas de preñez casi siempre con un promedio de entre 70 y 90% con semen sexado. (14)
- En hatos que no tienen un buen manejo reproductivo, sumado la mala praxis del inseminador ocasiona índices de preñez extremadamente bajos.
- En programas de Inseminación a tiempo fijo (IATF); tiene ventaja por eliminar la necesidad de la detección del celo. Sin embargo, requieren más semen por inseminación que las inseminadas por la detección del calor.
- El semen sexado encarece aun más los programas de IA a tiempo fijo, tanto por el costo y riesgo para la fertilidad. (14)

2.4.2 Inseminación Artificial a Celo Detectado con Semen Sexado

En este punto se incluyen trabajos en los que se empleó la inseminación a celo detectado, independientemente de si el celo fue natural o sincronizado. Se llevaron a cabo una serie de experimentos para evaluar el comportamiento del semen sexado, fresco y congelado, en la IA de 1370 vaquillonas sincronizadas. Se utilizaron 22 toros de fertilidad desconocida. (22)

Las tasas de preñez logradas, utilizando dosis inseminantes de 1 a 1,5 millones de espermatozoides sexados congelados, fueron entre 10 y 30% inferiores a las obtenidas con los controles, donde se empleó semen convencional, a razón de 20 a 40 millones de espermatozoides por dosis. Además, la exactitud del sexado promedió 90% y los terneros nacidos resultaron normales. (22)

Estos resultados preliminares alentadores motivaron a los investigadores la realización de otros estudios tendientes a definir la dosis inseminante óptima y el lugar de descarga del semen más indicado para efectuar la inseminación. (14).

Más recientemente, llevaron a cabo otra serie de experimentos en los que se inseminaron vaquillonas y vacas, utilizando semen congelado en dosis inseminantes que oscilaron entre 1 y 6 millones de espermatozoides sexados, los cuales fueron depositados en el cuerpo del útero o en el tercio medio de ambos cuernos uterinos. (22)

Como control, se empleó semen convencional a una dosis de 20 millones de espermatozoides. Cuando se utilizaron dosis que variaron entre 1,5 y 6 millones de espermatozoides sexados, el porcentaje de preñez resultó similar. Del mismo modo, el lugar donde se efectuó la descarga del semen no modificó los resultados. En cambio, cuando se utilizó la dosis 1



millón de espermatozoides, el porcentaje de preñez resultó inferior y la descarga del semen en los cuernos uterinos afectó negativamente la tasa de preñez. (22)

En la mayoría de estos experimentos, el porcentaje de preñez obtenido con el semen sexado fue significativamente menor que el logrado con el semen convencional. Factores como condición corporal, edad, manejo reproductivo y sanitario, y eficiencia en la detección de celo, fueron críticos para obtener buenos resultados. (22)

En un trabajo similar, se comparó el porcentaje de preñez en vaquillonas inseminadas con semen sexado con una dosis de 2 millones de espermatozoides y convencional cuya dosis fue 15 millones de espermatozoides. El experimento incluyó 9 toros de las razas Holstein, Jersey y Rojo Danesa. Las diferencias en los porcentajes de preñez, siempre a favor del semen convencional, fueron 12%, 7% y 5%, respectivamente. Tanto las diferencias raciales



como las observadas entre toros, no alcanzaron significancia estadística probablemente a consecuencia del bajo número de animales inseminados. (22)

Estudios recientes demostraron que la menor fertilidad que se obtiene con el semen sexado se debe al bajo número de espermatozoides que contiene la dosis inseminante y en menor medida, al daño causado a los espermatozoides por el proceso de sexado. Además, los efectos de la baja dosis y del proceso de sexado difieren entre toros. (22)

En Argentina se han realizado pocos estudios comparando los porcentajes de preñez obtenidos luego de inseminar con semen sexado y convencional; en ellos se observó que el porcentaje de preñez promedio obtenido con el semen sexado, resultó un 30% menor al logrado con el convencional. (22)

Grafico 11. Técnica de inseminación artificial con el uso de semen sexado



Fuente: [Internet].

<http://www.otavalo.gob.ec/noticias.php?var=482>

2.4.3 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO CON SEMEN SEXADO (IATF).

En un experimento donde se evaluó la utilización del semen sexado en un programa de IATF que incluyó 209 vaquillonas Holstein, la sincronización se efectuó mediante la administración de dos dosis de PGF2 α separadas por 14 días. La inseminación se realizó a las 80 y 82 h post 2da dosis de PGF2 α utilizándose una dosis de 2 millones espermatozoides, proveniente de toros de la misma raza. (22)

Grafico 12. Hormonas empleadas para la sincronización de celos.



Fuente: <http://es.paperblog.com/hormonas-para-la-iatf-427298/>

El semen fue depositado en diferentes sitios: el cuerpo del útero, la mitad de uno de los cuernos, o cerca de la unión uterotubárica. Para determinar el cuerno donde descargar el semen se utilizó la ultrasonografía, con el objetivo de detectar la presencia de un folículo asumido como preovulatorio. Un hecho importante es que en el momento de la inseminación, las vaquillonas fueron clasificadas según la intensidad del celo, la cual podía ser fuerte o

débil. (22) Los porcentajes de preñez en inseminaciones efectuadas en el tercio anterior del cuerno uterino: 39,3% (24/61) y en el tercio medio: 49,1% (28/57) resultaron similares entre sí y no difirieron de las realizadas en el cuerpo del útero: 41,7% (38/97). En cambio, el porcentaje de preñez de vaquillonas con signos intensos de celo (45,9%) fue superior al de aquellas con signos débiles (20,8%). (22)

En programas de reproducción como la Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) se han efectuado estudios sobre semen sexado únicamente en animales sincronizados con dispositivos a base de progesterona. En uno de estos experimentos se utilizaron 150 vaquillonas Holando Argentino que fueron inseminadas a tiempo fijo con 3 millones de espermatozoides sexados. Previamente, conformaron 3 grupos idénticos: en el Grupo 1 se utilizó el protocolo tradicional: día 0, colocación del dispositivo + administración de benzoato de estradiol; día 8, retiro

del dispositivo + administración de PGF2 α ; día 9, administración de benzoato de estradiol; día 10 (hora 52), IATF. (22)

En los restantes grupos, se administró media dosis de PGF2 α al colocar el dispositivo, con el objetivo de lograr un mayor control de la dinámica folicular, manteniendo el mismo horario para la IATF (Grupo 2) ó posponiéndola hasta la hora 60 (Grupo 3). Los porcentajes de preñez de los Grupos 1, 2 y 3 fueron similares: 44%, 36% y 40%, respectivamente. (22)

Un trabajo reciente involucró 158 vaquillonas, raza Hereford de 19 meses de edad. Las mismas fueron divididas al azar en dos grupos. Al Grupo 1 se lo sincronizó para ser inseminado a tiempo fijo, con un dispositivo liberador de progesterona, más la inyección al mismo tiempo de 0,021 mg de GnRH. Siete días después, el dispositivo fue retirado inyectando al mismo tiempo 150 ug de PGF2 α . A las 67–68 h posteriores al retiro del dispositivo se



procedió a la inseminación junto a la inyección de 0,021 mg de GnRH (Subgrupo 1A) y a las restantes se les inyectó 0,0105 mg de GnRH, (Subgrupo 1B). El Grupo 2 fue sincronizado con 2 dosis de PGF α con 11 días de intervalo entre ambas, y se realizó detección de celo e inseminación durante 5 días utilizando el sistema AM/PM. (22)

Todas las vaquillonas fueron inseminadas con 2 millones de espermatozoides sexados. El diagnóstico de gestación realizado mediante ecografía a los 30 días post inseminación. En el porcentaje de preñez, no se registran diferencias entre ambos subgrupos del Grupo 1: 54,7 y 55% para los subgrupos 1A y 1B, respectivamente; no observándose a su vez diferencias entre el Grupo 1: 54,9% y el Grupo 2: 52,6%. (22)

Tabla 1. Resultados de preñez obtenidos a partir de inseminaciones efectuadas con semen sexado y no sexado (convencional), congelado/descongelado



utilizando distintas dosis inseminantes y lugares de descarga del semen.

TRATAMIENTO	Millones de Espermatozoides	Tipo de semen	Total IA	Preñeces	
				N	%
Experimento 1	1.5	Sexado	211	113	53,5a
	20	Convencional	112	75	66,9b
Experimento 2	1.5	Sexado	123	67	54,4a
	4.5	Sexado	122	62	50,8b
	20	Convencional	126	85	67,4b
Experimento 3	2	Sexado	38	18	47,3a
	6	Sexado	37	21	56,7a
	20	Convencional	40	29	72,5b
Experimento 4	3	Sexado,	42	21	50,0a
	3	cuerpo	42	24	57,1 ^a ,b
	20	Sexado,	21	16	76,2b
		cuerpo			
Experimento 5		Convencional			
	1	Sexado,	119	38	31,9a
	1	cuerno	123	57	46,3b
	3	Sexado,	123	63	51,2b
	3	cuerpo	121	57	47,1b
	20	Sexado,	124	74	59,7c
		cuerno			
		Sexado,			
		cuerpo			
		Convencional			

Fuente:http://200.45.54.156/revista/20-2/RevVet_vol%2020_nro%202_2009--16_Utilizacion_Oses.pdf



2.4.4 CÁLCULO DE LOS BENEFICIOS Y COMPARACIONES.

Por la importancia económica de la tasa de natalidad y el costo por la preñez en una granja de ganado lechero, este estudio tiene como objetivo analizar y comparar la tasa de natalidad, mediante el uso del semen sexado y semen convencional, verificar además, el porcentaje de sexo de las crías nacidas, la eficiencia (la fertilidad) del semen sexado (número de terneros nacidos del sexo elegido) y el análisis de los resultados financieros. (19).

Varios parámetros económicos deben ser bien definidos de acuerdo a las características particulares de la lechería y las condiciones del mercado. Para ilustrar nuestro análisis vamos a definir unos parámetros básicos. El costo por unidad del semen convencional y semen sexado puede definirse en \$15 y \$45, respectivamente, lo cual indica un sobre precio de unos \$30 cuando se usa semen sexado comparado al semen convencional. Además, deben establecerse otros parámetros económicos. El valor de la ternera puede ser considerado en \$562 mientras que el valor del macho puede ser de \$48.



El costo de mantenimiento de las vaquillas no preñadas entre 15 y 20 meses de edad se toma en \$2.4/d. El peso promedio a los 20 meses de edad para las vaquillas no preñadas se calcula en 505 kg, el valor de salvamento (desecho) en \$1.79/kg y el valor del reemplazo, de una vaquilla preñada del mismo peso, en \$1,200. Finalmente, una tasa de descuento, similar a la mínima tasa de interés cobrada por las compañías de tarjetas de crédito de 12% se usa para calcular el VPN de los programas estudiados (Tabla 2). (10)



Tabla 2. Parámetros económicos bases de un programa reproductivo de semen convencional y semen sexado en vaquillas.

Parámetro en Dólares	Costo
Dosis de Semen	15Convencional/ 45 Sexado
Valor de la Ternera	562
Valor del Ternero	48
Costo de mantenimiento de la vaquilla 15-20 meses	2.40 por día
Valor de salamento de la vaquilla no preñada de 20 meses	904
Valor de reemplazo de una vaquilla preñada de 20 meses	1,200
Tasa de descuento	12% anual

Fuente: Cabrera V.

http://www.accelgen.com/docs/repro_connections/sp.vol.1.issue.5.pdf



2.4.5 LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

2.4.6 Importancia

La transferencia de embriones en los últimos años ha producido un crecimiento que potencia la IA es el caso de Multiovulación y Transferencia de Embriones (MOET) que consiste en administrar una cantidad controlada de hormonas a hembras seleccionadas por sus cualidades genéticas y en respuesta dan origen a la superovulación, es decir que se generen varios óvulos en vez de un solo óvulo fecundable. Por medio de la Inseminación Artificial (IA) estos óvulos son fecundados con espermatozoides de sementales altamente calificados. Unos 7 días después de la fecundación artificial, los embriones generados por los óvulos son extraídos de la matriz de la vaca por medio de una sonda y posteriormente implantados en

el útero de otra vaca nodriza, que será la que desarrolle y de lugar a la preñez (9)

Con este sistema una vaca selecta puede tener varias hijas por año, a diferencia del sistema natural donde solo puede parir una ternera anual. La técnica ha evolucionado de manera sorprendente y no se limita a la obtención de varias crías de una misma vaca, sino que los embriones pueden sexarse, dividirse y caracterizarse molecularmente para determinar en ellos la existencia de genes favorables caso contrario descartar su utilización. (9)

En el área de la zootecnia, la necesidad de optimizar al máximo la producción, así como mejorar la calidad del producto final ha impulsado la investigación en el campo de la reproducción, dando origen a las denominadas Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA), cuyo uso como el de cualquier otra tecnología está condicionado por el beneficio real y el costo.(21)

Por otro lado, un aspecto que ha afectado el desempeño de la ganadería lechera ha sido la ausencia de hembras de reemplazos las cuales deben de continuar con la producción. Un hato lechero creciente demanda una mayor cantidad de vientres de reemplazo para incrementar la producción lechera y cubrir la demanda de vaquillas al resto de ganaderías. Sabiendo que las vaquillas de razas lecheras tienen un valor comercial superior al de los terneros machos. (9)

2.4.7 VENTAJAS.

- La producción de embriones permite incorporar hembras como fuente de material genético. (24)
- Reduce el tiempo y costo de producción e Incrementar el número de hembras (vientres

reproductores) para el comienzo de un nuevo núcleo de raza o cruzamiento. (5)

- Obtención de un mayor número de progenie de hembras de alto valor genético. (24)
- Expansión rápida de núcleos de vacas seleccionadas (24)
- Permite la conservación de animales de alta producción y valor genético, permitiendo acelerar el progreso genético con animales superiores por el doble aporte (materno y paterno). (24)
- La técnica permite repetir la operación varias veces dentro de una misma estación, incrementando el número de terneras de una misma donante.(24)
- Del conocimiento y dominio de la técnica de cada una de las tecnologías como: superovulación, la recolección de embriones, corto período de cultivo in vitro, manipulación, congelación y

transferencia dependerá el resultado a obtener.
(24)

- No parece haber una gran variación en la fertilidad del esperma sexado para la superovulación. (24)

Grafico 13. Esquema del proceso de transferencia de embriones.



Fuente:

<http://www.inia.gob.pe/imagen/imagen.htm>



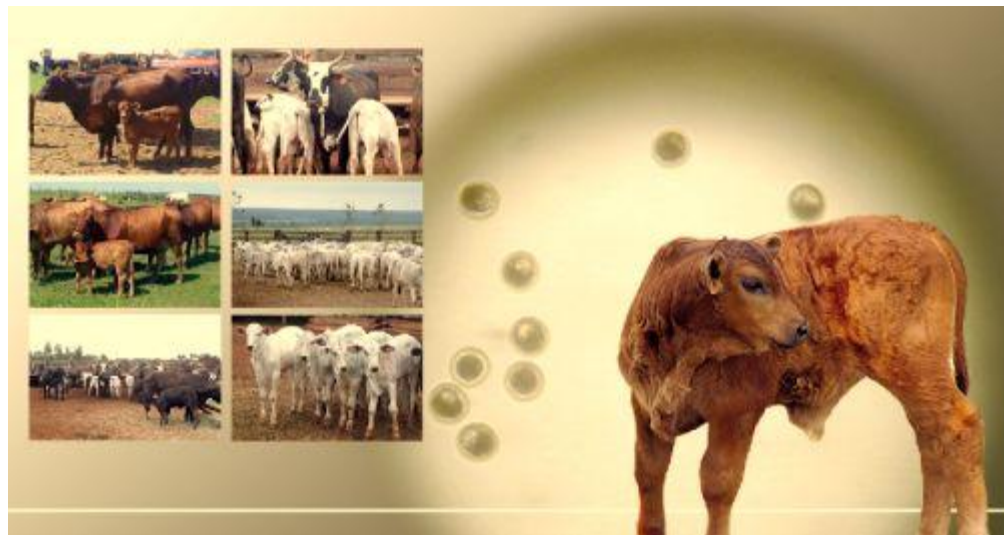
2.4.8 DESVENTAJAS.

- Es una tecnología complicada y con costos demasiado caros.
- La respuesta individual al tratamiento de la superovulación de la donadora no siempre es la adecuada.
- Su uso aplicado con fines investigativos y ganaderías de elite.
- Los embriones adecuados para la transferencia de embriones se disminuye 30 a 50% con el uso de semen sexado.(24)
- El conocimiento de la técnica y su ejecución para personal calificado.

2.4.9 Utilización del semen sexado bovino en programas de transferencia embrionaria acorde a los últimos avances.

La combinación de superovulación y transferencia de embriones (TE) utilizando semen sexado, permite diseñar estrategias cuando se comercializan animales de alto valor genético o cuando se desea conformar un núcleo genético más rápidamente. Existen diferentes trabajos donde se evaluó la utilización del semen sexado en donantes incluidas en programas de TE. (22)

Grafico 14. Bovinos obtenidos por transferencia de embriones.



Fuente: [en línea].

<http://www.viradolce.com/transferencia.php>

Se ha reportado el comportamiento de diferentes dosis inseminantes de semen sexado y convencional, en vaquillonas y vacas donantes de embriones en las cuales la inseminación se efectuó en el cuerpo del útero. En un primer experimento en el que se utilizaron vaquillonas y vacas Angus y semen de dos toros de la misma raza, compararon dos dosis de semen sexado (2 y 10 millones de espermatozoides) con una dosis de semen convencional de 40 millones de espermatozoides, procediendo a realizar dos inseminaciones, a las 12 y 24 horas de haber detectado celo mediante observación visual. (22)

El porcentaje de ovocitos fecundados y el número de embriones transferibles obtenidos con ambas dosis de semen sexado fue similar y resultó menor que el logrado con semen convencional. (Tabla 2). (22)

En el segundo experimento, en el que se utilizaron vaquillonas Holstein y tres toros de la misma raza, compararon dos dosis de semen sexado (2 y 20

millones de espermatozoides) con semen convencional 40 millones de espermatozoides, procediendo a realizar una inseminación a tiempo fijo, 70-72 h post-administración de PGF2 α . El porcentaje de ovocitos fecundados difirió en las tres dosis inseminantes. El número de embriones transferibles de la menor dosis de semen sexado difirió del obtenido utilizando semen convencional, en cambio la dosis mayor de semen sexado no difirió de la dosis de semen convencional utilizada (Tabla 2). (22)

Grafico 15. Lavado de ovocitos en medios de conservación.



Fuente: [en línea].

<http://www.viradolce.com/transferencia.php>

Los embriones de este experimento fueron transferidos en fresco y congelados-descongelados. Con el semen convencional, los



porcentajes de preñez obtenidos fueron 63 y 89%, respectivamente. Para el caso del semen sexado dichos porcentajes fueron 67 y 40% respectivamente, resultando similares. (22)

Por su parte, en la Universidad Nacional de Córdoba, se diseñaron tres experimentos para evaluar el uso de semen sexado en protocolos de superestimulación en vacas Holstein. Utilizaron 44 vacas (20 en producción y 24 secas) y en cada experimento aplicaron un protocolo diferente de superestimulación, en donde variaron la administración o no de eCG y la utilización de LH o GnRH. Tanto en el primero como en el segundo experimento, la inseminación fue realizada a tiempo fijo, no así en el último en donde se realizó a celo detectado. En todos los casos, la dosis inseminante fue de 10 millones de espermatozoides. (22)

Los resultados de cada experimento se muestran en la Tabla 2. En este trabajo, se demostró que con la utilización de semen sexado con 10 millones de espermatozoides por dosis, se obtiene menor cantidad de ovocitos fecundados que con el semen convencional y también menos embriones transferibles. (22)



En un trabajo realizado con animales incluidos en programas comerciales de transferencia embrionaria, se efectuaron tres ensayos utilizando diferentes esquemas de inseminación y dosis de semen sexado. En el primer ensayo utilizaron vaquillonas que fueron inseminadas con semen sexado y convencional 12 y 24 horas luego de haber sido detectadas en celo, utilizando 5 millones de espermatozoides en cada inseminación. Los porcentajes de ovocitos fecundados y de embriones transferibles fueron similares para semen sexado y convencional (Tabla 2), no obstante, el número de embriones transferibles fue menor para semen sexado. (22)

En el segundo ensayo, vaquillonas fueron inseminadas utilizando el mismo esquema e igual dosis que en el ensayo anterior, comparando semen sexado fresco con semen sexado congelado. La producción de embriones para ambos tratamientos fue similar y no difirió de aquella obtenida con semen convencional (Tabla 2). Cuando los embriones fueron transferidos, el porcentaje de preñez obtenido con aquellos provenientes de semen sexado (70,4%) fue similar al logrado con el de los provenientes de la utilización de semen convencional (72,4%). (22)



En el tercer ensayo, se utilizó exclusivamente semen sexado congelado en vaquillonas y vacas. Se comparó un esquema de simple inseminación, 18–24 horas post detección de celo con 5 millones espermatozoides con esquemas de doble inseminación, 12 y 24 horas post detección de celo, en los que se utilizaron dosis de 2, 5 y 10 millones de espermatozoides en cada inseminación. La conclusión a la que se llegó es que el esquema de inseminación con dos dosis de 5 x millones de espermatozoides resulta el más apropiado tanto para vaquillonas como para vacas. (22)

Otros trabajos publicados en Argentina proponen un esquema de inseminación diferente. Recomendaba utilizar cuatro dosis de 10 millones de espermatozoides cada una, e inseminar al momento de detectar el celo, a las 12 h con dos dosis y por último, a las 24 h. Además, se debe tener en cuenta la historia reproductiva de la hembra en el momento de elegir la donante, ya que no se usa semen sexado en vacas que vienen de dos o tres colectas negativas, es decir, sin producir embriones viables con semen convencional. (22)

Tabla 3. Ovocitos fecundados y embriones transferibles en donantes inseminadas con semen sexado y convencional, congelado/descongelado.

Esquema de IA	tipo de semen			Ovocitos fecundados (%) (n)	Embriones Transferibles (%) (n)
		Millones De espermatozoides	N		
Experimento 1 (2 inseminaciones, 12 y 24 horas post-detección celo)	S.S	2	30	40±6,0	3,3±0,9 ^a
	S.S	10	30	49±6,0 ^a	4,1±0,9 ^a
	S.C	40	29	69±6,1	8,7±0,9
Experimento 2 IATF (70–72 horas post–2da PGF2α)	S.S	2	31	28±7,1	1,3±0,5 ^a
	S.S	20	34	49±6,8	2,0±0,5 ^b
	S.C	40	33	72±6,9	3,1±0,5 ^b
Experimento 1 IATF (12 y 24 horas post LH)	S.S	10	12	0,58±0,34	0,58±0,34
	S.C	10	12	4,08±1,94	3,58±1,85
Experimento 2 IATF (12, 18 x 2 y 24 h post GnRH)	S.S	10	5	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a
	S.C	10	5	6,00±2,00	5,60±2,09 ^b
Experimento 3 celo detectado SS: (12, 18 x 2 y 24 h post GnRH) y SC: (12 y 24	S.S	10	5	0,40±0,24	0,40±0,24
	S.C	10	5	5,80±2,15	5,60±2,25



h post GnRH)					
Experimento 1 (2 inseminacion es, a 12 y 24 horas post- detección celo)	S.S.F C	5 5	5 5	78,2±11,0 94,7±2,5	53,4±11,6 68,1±9,7
Experimento 2 (2 inseminacion es, 12 y 24 horas post- detección celo)	S. S.F S. C S.C	5 5 5	10 9 26	91,3±4,5 96,3±2,5 91,1±3,4	59,5±9,3 69,0±8,9 70,3±4,9

Simbología: (S.S.: Semen sexado; S.C.: Semen convencional; S.S.F.: Semen sexado fresco; S.S.C.: Semen sexado congelado.) Valores expresados como promedio \pm EE. Letras diferentes en la misma columna de un mismo experimento indican diferencias significativas.

Fuente: MV Oses, MT Teruel [Internet].

http://200.45.54.156/revista/20-2/RevVet_vol%2020_nro%202_2009--16_Utilizacion_Oses.pdf



2.4.10 LA FERTILIZACIÓN IN VITRO CON SEMEN SEXADO ACORDE A ÚLTIMOS AVANCES

La combinación de superovulación y transferencia de embriones (TE) utilizando semen sexado, permite diseñar estrategias cuando se comercializan animales de alto valor genético o cuando se desea conformar un núcleo genético más rápidamente. Existen diferentes trabajos donde se evaluó la utilización del semen sexado en donantes incluidas en programas de TE. (22)

2.4.11 Importancia

La fertilización in vitro (FIV) es una técnica de reproducción asistida que permite desarrollar un embrión a partir de la unión de un óvulo con un espermatozoide sexado en medios especiales de laboratorio que imiten las condiciones fisiológicas de fecundación. (11)

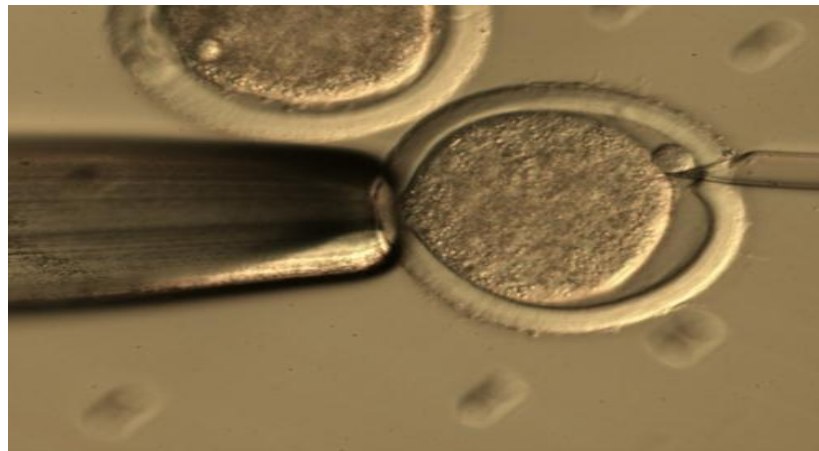
De otro lado, la producción in vitro de embriones (PIVE) bovinos es una excelente herramienta que se

viene utilizando en combinación con semen sexado, presentando una positiva relación costo beneficio. (6).

Una dosis de semen sexado tiene un valor mucho más elevado que una dosis de semen convencional y por tanto, debe de ser aprovechada al máximo la PIVE permite un mejor aprovechamiento del semen, ya que se requiere una concentración más baja de espermatozoides para llevar a cabo la fecundación comparada con las concentraciones requeridas en la inseminación artificial; además, una sola dosis puede ser utilizada para muchas vacas. (6)

Tal es el caso de una pajilla de 2 millones para 10 donadoras. (7) Multiplicar la mejor genética aceleradamente como es el caso de las vacas más productoras de leche con toros probados mejoradores. Para Incrementar el numero de hembras de reposición a un bajo costo, de manera que genera mayores ingresos económicos que son de utilidad a los hatos dedicados a la producción lechera. (7) Y finalmente hacer una Selección “natural” por fertilidad (“over-fertility”) de las hembras que componen el hato. (7)

Grafico 16. Proceso de fecundación in vitro visto al microscopio.



Fuente: [en línea].

<http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>

2.4.12 Ventajas

Se utiliza principalmente en vacas que por distintas causas no pueden dejar descendencia a través de las técnicas reproductivas convencionales. (11)

- Producción de mayor número de embriones con sexo determinado.



- Producción de embriones de vacas y vaquillonas gestantes.
- Utilización de becerras y prepúberes.
- Una pajilla es suficiente hasta para 10 donantes
- Utilización de vacas que no responden a TE
- Utilización de animales con problemas reproductivos
- Utilización de animales muertos.
- Utilización de vacas con alteraciones anatómicas que impiden una correcta fecundación.(7)
- Una hembra F1 preñada es un tesoro para un productor de leche. (7)
- Una hembra F1 preñada con un embrión F1 sexado hembra e implantado en el vientre no tiene precio. (7)
- Disminución del estrés de manejo. (4)

- La técnica permite aplicarla sin interacción sobre la ovulación. (32)
- Utiliza varios sementales sobre una misma vaca. (22)
- Evita la transmisión de enfermedades. (32)
- Realización durante largos períodos fisiológicos.(32)
- Insustituible en la Conservación de Recursos Genéticos y Propicio para la investigación. (32)

2.4.13 Desventajas

Una de las limitaciones del uso de semen sexado en la FIV con semen sexado es la alta variabilidad en los resultados de. (6)

- Reducción de las tasas de fecundación y desarrollo embrionario (6)

- Probablemente, la causa de estas variaciones sea el hecho de que durante la producción de semen bovino sexado y congelado las células son expuestas a numerosos factores que pueden afectar su capacidad fecundante como la dilución, la incubación, la exposición a un fluorocromo, presiones elevadas, láser de luz UV, congelación y en el laboratorio donde se vaya a llevar a cabo la fertilización in vitro (FIV) el semen debe de ser descongelado y preparado con el propósito de obtener una fracción espermática con capacidad fecundante y libre de crioprotectores, para lo cual los espermatozoides deben de ser centrifugados. (6)
- Los numerosos factores que pueden afectar a los espermatozoides pueden producir especies reactivas de oxígeno (EROS). (6)
- Se ha comprobado que las especies reactivas de oxígeno EROS generadas en la manipulación del semen bovino pueden causar un daño oxidativo, el cual altera el adecuado funcionamiento de la membrana plasmática de los espermatozoides; además, puede causar fragmentación en el ADN de los espermatozoides. (6)



- Menores tasas de formación de blastocistos. (30)
- Menores tasas de preñez (30)
- Capacitación parcial del esperma (30)
- Dilución espermática y variaciones entre toros (30)
- Lamentablemente, el enfoque de la FIV también incurre en los costos de la transferencia de embriones, encareciendo aun más los valores de esta biotecnología.
- Este proceso de determinación del sexo es relativamente caro, y los embriones del sexo menos valioso a veces se descartan. (14)

2.4.14 Utilización de semen sexado en programas de fertilización in vitro con semen Sexado.

La fertilización in vitro con semen sexado depende de las cualidades del ovocito e igualmente los espermatozoides utilizados. Por lo tanto, después de

la maduración, los ovocitos son expuestos a los espermatozoides para producir la fecundación como ocurre en forma fisiológica, las células espermáticas deben alcanzar su capacidad fecundante, a través de un proceso de preparación in vitro con objeto de iniciar su capacitación o desencadenar la reacción acrosomal. (30)

Grafico 17. Becerros obtenidos de la colecta y transferencia de una donante bovina.



Fuente: [en línea].

<http://gen-ova.com/transferencia-de-embriones-en-bovinos/contenido/20/es/>



La heparina ocupa un papel fisiológico importante en la capacitación y espermática usada durante el proceso in vitro, desencadena la capacitación y finaliza con la reacción acrosómica, permitiendo la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida. La técnica de selección y preparación de espermatozoides (swin up e gradiente de Percoll) tiene el objetivo de separar los espermatozoides del líquido seminal y del diluyente y así obtener espermatozoides con un mínimo de 70% de motilidad progresiva.

Los ovocitos y espermatozoides son incubados en un medio específico, por un periodo de aproximadamente 18 horas a temperatura de 39 ° C en atmósfera de 5% de CO₂ en una cámara saturada. (30)

Luego se fecunda, los posibles cigotos son transferidos a un medio de cultivo donde permanecerá hasta adquirir el estado de blastocisto. Las condiciones de cultivo pueden influenciar las cualidades de los embriones y envolver factores como medio, atmósfera gaseosa, densidad, presencia o no de un medio de cultivo y algún tipo de suplementación proteica. Los medios simples como fluidos de oviducto sintético (SOF) puede ser

substituido por un co-cultivo en un medio enriquecido de células somáticas. (30)

Grafico 18. Embriones sumergidos en medios de cultivo.



Fuente: [en línea].

<http://boletinnadbio.blogspot.com/2009/11/laboratorio-de-embriologia-y.html>

La utilización de semen sexado en la producción in vitro de embriones permite disminuir el tiempo en el que se logran determinados objetivos, por ejemplo, mejorar la calidad del rodeo e incrementar el número de animales que lo integran. Dado que los resultados que se obtienen son variables, diversos investigadores han efectuado estudios tendientes a



mejorar las tasas de división y la calidad embrionaria. Los aspectos que se han tenido en cuenta son: maduración de los ovocitos, proceso de sexado, concentración espermática, cultivo de los embriones y criopreservación de los mismos. (30)

En un estudio se utilizaron ovocitos obtenidos a partir de ovarios de matadero y diferentes dosis de semen sexado y convencional proveniente de dos toros Holando Argentino. (18) La concentración de semen utilizada fue de 1 y 2 millones de espermatozoides para semen sexado y 1 millón de espermatozoides para semen convencional. La tasa de fertilización obtenida con semen sexado, aún con la mayor dosis utilizada, fue menor que con el semen convencional: toro A, 31% versus 77,3% y toro B, 52% versus 78,5%, respectivamente. (22)

El desarrollo embrionario con semen sexado fue más bajo que con semen convencional, independientemente del toro y de la concentración espermática utilizada (Tabla 4). En otro trabajo se empleó semen sexado de 6 toros Holstein para estudiar su eficiencia en un programa de producción



in vitro de embriones y comparar la ultraestructura de estos embriones con la de aquéllos producidos con semen convencional. Los ovocitos (n: 1852) provenientes de animales de matadero, fueron divididos en 6 grupos y fecundados con semen sexado de 6 toros Holstein y con semen convencional (n: 330 ovocitos) de un toro control. (22)

Las tasas de división y desarrollo a blastocistos fueron determinadas a los 2 y 7 días post-inseminación, respectivamente. Cuando se utilizó semen sexado, se observó una frecuencia significativamente alta de sesiones contaminadas. La cantidad de ovocitos fecundados en cada gota, fue significativamente más baja con semen sexado. La tasa de división con el semen sexado fue muy variable; con algunos toros se obtuvieron tasas que no difirieron del grupo control, mientras que con otros las diferencias fueron altamente significativas. Una situación similar se observó cuando se analizó la producción de blastocistos. (22)

Por último, los estudios ultraestructurales indicaron que algunos blastocistos producidos con semen



sexado presentaron más desviaciones en el número y estructuras de sus organelas, así como más envolturas nucleares dañadas que los blastocistos del grupo control. En base a los resultados, se concluyó que la tasa aceptable de blastocistos obtenida en uno de los grupos, indica que el semen sexado puede ser utilizado en la producción in vitro de embriones. (22)

Sin embargo, la alta variabilidad de los resultados, la alta tasa de contaminación, la reducida capacidad fecundante y las alteraciones estructurales, indican que se requieren mejoras adicionales para minimizar el daño de los espermatozoides durante el proceso de separación y conservación, para su aplicación con éxito en un programa comercial.

En otro ensayo se evaluó el efecto del semen sexado, congelado-descongelado en la producción in vitro de embriones.

El estudio involucró 16 partidas provenientes de 4 toros. Los ovocitos fueron recolectados de vacas Nelore por aspiraciones foliculares e inseminadas con semen sexado a una dosis de 1 millón de espermatozoides. La cantidad de embriones viables



difirió entre toros con 26,4%, 28,3%, 32,9% y 36,8% de blastocistos producidos para cada uno. Paralelamente, se observó un efecto de las diferentes partidas de semen congelado/descongelado de cada toro, con valores extremos de 10,3 y 32,9% para el toro A, 9,7 y 38,0% para el toro B, 23,0 y 34,6% para el toro C y 13,3 y 66,7% para el toro D. (22)

En busca de determinar las mejores condiciones para producir un alto porcentaje de blastocistos in vitro, se analizó el uso de cuatro tipos de semen (sexado, fresco y congelado, en una dosis de 1 millón de espermatozoides totales y convencional, fresco y congelado, con una concentración final de 2 millones de espermatozoides) provenientes de tres toros Holstein. En este trabajo se evaluaron las tasas de división y de desarrollo hasta blastocisto; paralelamente, los autores analizaron si el sexado del semen provocaba daños en el ADN de los embriones. (22)

La tasa de división embrionaria obtenida con semen sexado ($80,6 \pm 3,2$) fue mayor que la lograda con semen convencional ($68,2 \pm 4,5$); no obstante, los



resultados fueron inversos cuando se analizó el porcentaje de blastocistos ($10,6 \pm 4,5$ vs. $22,2 \pm 3,3$, respectivamente. A su vez, los resultados del trabajo demostraron un efecto significativo del toro sobre la tasa de división embrionaria; no así sobre la producción de blastocistos. (22)

Con respecto al análisis sobre motilidad, surgió que la misma fue mayor en el semen convencional fresco que en el sexado, congelado–descongelado. A su vez, el semen fresco (sexado o convencional), mostró menor porcentaje de espermatozoides con daños en sus membranas y menor actividad mitocondrial al compararlo con semen congelado (sexado o no sexado). Basado en ello, los autores postulan que el hecho de estar afectada la calidad espermática tanto por el proceso de congelación como por el sexado, explicaría en parte la escasa proporción de blastocistos que se obtiene cuando se utiliza semen sexado congelado. (22)

Es interesante demostrar que el semen sexado no incrementó el daño del ADN al compararlo con el convencional, lo que indicaría que el proceso en sí, no

induce daños en el mismo. La técnica de fertilización in vitro permite analizar diversos factores que podrían afectar en forma negativa los resultados de la utilización de semen sexado en dicho proceso. Uno de los aspectos estudiados es la concentración de heparina que se utiliza durante la capacitación espermática dado que aún la concentración ideal para obtener óptima cantidad de blastocistos necesita ser ajustada.

Semen	Dosis inseminante/mil- lones de espermatozoides	Ovocitos inseminad- os (n)	Blastocist- os producido s (%)	Bibliografi- a
S.S Toro A	1	184	3,2a	Medina y cols. (2002)
S.S Toro A	2	54	5,5a	
S.C Toro A	1	436	26,3b	
S.S Toro B	1	304	4,0 a	
S.S Toro B	2	83	12,0 b	
S.S Toro B	1	345	28,8 c	
S.S Toro A		310	4,9a	Palma y cols. (2007)
S.S Toro B		300	0,0a	
S.C Toro C	1	320	0,0*	
S.S Toro D		310	3,5 ^a	
S.S Toro E		302	—	
S.S Toro F		302	25,8b	



S.C (CONTRO E)		330	33,6b	
I				
S.S Toro A		137	12,7	Blondin y col. (2009)
S.S Toro B	2	195	17,5	
S.S Toro C		155	8,8	

actor mencionado anteriormente, adquiere relevancia sobre todo considerando que los espermatozoides que son sometidos al proceso de sexado están condicionados que puede inducir su capacitación en forma diferente a aquellos no sexados por la técnica de citometría.

Tabla 4. Resultados de diferentes trabajos en los que se utilizó semen sexado congelado/descongelado de diferentes toros en programas de fertilización in vitro.

Simbología: S.S.: Semen sexado; S.C.: Semen convencional.

Letras diferentes difieren significativamente de cada toro, Medina y cols. Entre toros, Palma y cols. * excluido del análisis estadístico por no presentar desarrollo embrionario.

Fuente: MV Oses, MT. http://200.45.54.156/revista/20-2/RevVet_vol%2020_nro%202_2009--16_Utilizacion_Oses.pdf

CONCLUSIONES

1. Los mejores resultados de la utilización del semen sexado se consiguen en vaquillas y vacas con una salud reproductiva excelente.
2. La utilización del semen sexado genera una mayor cantidad de hembras las mismas que permiten incrementar los ingresos a las explotaciones dedicadas al campo de la reproducción.
3. La técnica de citometría de flujo permite separar los espermatozoides X de Y con una confiabilidad cercana al 90% lo que garantiza con precisión el sexo esperado.
4. Los avances publicitados y comparados del semen sexado presentan resultados inferiores en comparación



con el semen convencional, tanto en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro.

SUMMARY

The use of sexed semen is an alternative major impact on livestock farms with greater interest in dairy herds, thanks to the technique of flow cytometry allows separation of sperm with the X chromosome Y being the first to contain 3.8 to 4% more DNA resulting in approximately 90%, with female sex determination security so that our interest is to focus on the importance, advantages and disadvantages of the use of sexed semen applied to biotechnologies such as artificial insemination, embryo transfer, and in vitro fertilization, artificial insemination being more intensively used sexed semen in heifers especially for the large percentage of fertility compared with cows that have had less travel in their reproductive history, meanwhile in embryo transfer and IVF is recent research purposes only,

Autor: Camilo Urbina Quito

Tema: "UTILIZACIÓN DE SEMEN BOVINO SEXADO EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, TRANSFERENCIA EMBRIONARIA Y FERTILIZACIÓN IN VITRO"

Página 112



and the time has to know the virtues of this biotechnology in the service of livestock breeding management.



BIBLIOGRAFÍA

1. **FAULKNER LC, PINEDA MH.** Biología del sexo. In: McDonald L, editors. reproducción y endocrinología veterinaria. Philadelphia: Nueva editorial Interamericana; 1978. p. 179-197.
2. **GIOVAMBATTISTA G, PERAL PILAR.** Genética de los animales domésticos. 1a ed. Buenos aires: editor. Inter-Médica; 2010. P. 1-2
3. **Gutiérrez de La Rocha, Ramos I.** Conocimientos Prácticos en la Inseminación Artificial en ganadería. Manual de Asistencia técnica No.53. Santafé de Bogotá: Produmedios; 1992. p. 14
4. **NICHOLAS F.** Introduction to Veterinary Genetics, 1a ed. Oxford University: editor. Oxford University press; 1996. P.337-339

5. **RIPALME E.I.R.L.**, editor. Mejoramiento Genético. 1era ed. Lima: Biblioteca Nacional Del Perú; 2005. P. 20.22
6. **ÁNGEL D, CAMARGO O.** Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización in vitro sobre la membrana plasmática y el adh de semen bovino sexado. Revista CES Vol. 4 Nº 2, 2009 [Internet]. 2009 Julio: [citado 20 Noviembre 2009]; 29-37 (29): [aprox. 1 p.]. Disponible en: http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo_3.pdf
7. **Asociación venezolana de Producción Animal** [Internet]. Venezuela: Asociación; c-2006 [actualizado 2001 Aug 23; citado 2012 Julio 1]. Vitrogen Venezuela; [aprox 1 pantalla]. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/jornada_leche_III/fertilizacion_in_vitro.pdf
8. **BARRIOS D.** Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. [Internet]. Venezuela: Facultad de Ciencias veterinarias de la universidad Central de Venezuela; 2012 [citado 1 Julio 2012]. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/diegotbarrios.PDF



9. **BERNARDI, S.F.; ALLENDE, R.; MAZZEO, R.** InVet Vol. 13 Nº 2, 2011; Monti, J.; Marini, P.R. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial [Internet]. R. InVet Vol. 13 Nº 2, 2011 [Internet]. 2011 Diciembre 20: [citado 1 jun 2012]; 25-38 (13): [aprox. 1 p.]. Disponible en: <http://www.fvet.uba.ar/publicaciones/archivos/vol13-v2/Vol-13-N-2-Articulo-III.pdf>
10. **CABRERA V.** Semen Sexado Grandes Ganancias en Vaquillas Bien Manejadas: Repro conexions. Accelerated Genetics Vol. 1 Nº 5, [Internet]. 2007 Jun [citado 2012 Jul 1]; 1-4(2): [aprox 1 p.]. Disponible en: http://www.accelgen.com/docs/repro_connections/s.p.vol.1.issue.5.pdf
11. **CORTÉZ R,** autor. Comparación del uso de la biotecnología reproductiva entre Humanos y Bovinos. r cáncer [Internet]. Veracruz: Universidad de Veracruz; 2011 [citado 2011 Feb 9]. Disponible en: http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/28461/1/Cortes_Lazcano_Roxana.pdf

12. **EL SEXADO DEL SEMEN BOVINO** [Internet]. Argentina: Depto; 2007 [actualizado 2007; citado 2012 julio 1]. Técnico de ABS Argentina; [aprox. 1 pagina]. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/81-sexado_semen.pdf
13. **Fertilidad de semen sexado"x" comercial en vacunos de leche** [Internet]. Huánuco Perú: Spermova; 2011 Enero 1 [actualizado 2011; citado 2012 julio 1]. Asociación Peruana de Reproducción Animal; [aprox. 1 pagina]. Disponible en: <http://www.reproduccionanimal.org/site1/images/stories/reproduccion/revista01/FERTILIDAD-DE-SEMEN-SEXADOvillanueva2011-106-107.pdf>
14. **GEORGE E, SEIDEL** Uses of sex-sorted semen. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Colorado State University, Fort Collins, CO [Internet]. Sep 1 2011: [citado 1jun 2012]; 349-352: [aprox. 1 p.]. Disponible en: <http://www.appliedreprostrategies.com/2011/joplin/proceedings/25seidel.pdf>
15. **GOVAIKE**. Semen sexado Su Impacto en la producción animal [Internet]. Argentina: Empresa de procesamiento de semen; c-2007 [actualizado 2007; citado 2012 Julio 1]. Govaике; [aprox 1



pantalla]. Disponible en:
http://www.forodegeneticabovina.com/congresobanner/download/martin_panarace.pdf

16. **HOSSEPIAN DE LIMA V, MOREIRA-FILHO C.** Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll [Internet]. Sociedade Brasileira de Zootecnia. Brasileira de Zootecnia Vol. 40 Nº 8, 2011 [Internet]. 2010 May: [citado 1 jun 2012]; 1680-1685 (9): [aprox. 1 p.]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v40n8/08.pdf>
17. **JIMÉNEZ C.** Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en Reproducción bovina [Internet]. 2010 [citado 2012 Jul 1]; 1-6(3): [aprox 1 p.]. Disponible en: <http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8209.pdf>
18. **MARINI, GALASSI.** Relación entre celo–inseminación con semen sexado y porcentaje de preñez en vaquillonas Holstein. Rev. vet. 22 [Internet]. 2011: [citado Julio 1 2012]; 52-54 (1): [aprox. 1 p.]. Disponible en: http://www.produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/185-Marini.pdf



19. **MEIRELLES, FARIA, SOUZA, WEISS.** Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino: aspectos de viabilidade reprodutiva e econômica. Archives of Veterinary Science [Internet]. Oct 10 2008: [citado 1 Jun 2012]; 98-103 (13): [aprox. 1 p.]. Disponible en: <http://www.sumarios.org/sites/default/files/pdfs/12888-42834-1-pb.pdf>
20. **MORILLO, M, SALAZAR, S, E.** 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias 60 p. [Internet]. 2012: [citado 20 Oct 2012]; 1-60 (30): [aprox. 1 p.]. Disponible en: http://ojs.inia.gob.ve/pub/Eval_poten_repro_macho%20bovino_VD.pdf
21. **MUÑO OTERO R.** Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas [Internet]. España: Universidad Santiago de Compostela; 2010 [citado 2012 Jul 4]. Disponible en: http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2406/1/9788497509886_content.pdf



22. **OSES MV, TERUEL MT.** Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. UNCPBA [Internet]. 2009 Agosto 31: [citado 1 jun 2012]; 138-145 (20): [aprox. 1 p.]. Disponible en: http://200.45.54.156/revista/20-2/RevVet_vol%2020_nro%202_2009--16_Utilizacion_Oses.pdf
23. **PÉREZ C, MARÍN.** Impacto de la utilización del semen sexado. [Internet]. 2009: [citado 1 jun 2012]; 24-35: [aprox. 1 p.]. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_MG/MG_2009_217_34_37.pdf
24. **RODRÍGUEZ M, VALLEJO A, BATISTA P.** Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. GANGUE. [Internet]. Octubre 31 2011: [citado Julio 1 2012]; 48-49 (31): [aprox. 2 p.]. Disponible en: http://www.eemac.edu.uy/cangue/joomdocs/cangue031_rodriguez.pdf
25. **Sexaje de Semen Valor de su Aplicación en Producción Lechera y Porcina** [Internet].



Argentina: laboratorio; [actualizado 2008; citado 2012 junio 31]. *fisicabiologica*; [aprox.4 páginas]. Disponible en:
<http://www.fisicabiologica.com.ar/curso-criopreservacion-de-gametas-2009/ppt/L%20%20Sexado%20de%20Semen%20Aplicacion%20en%20ganado%20lechero%20y%20porcino.pdf>

26. **Sexado fetal de gemelos Inducidos por Transferencia de Embriones Fertilizados con Semen Sexado** [Internet]. [actualizado 2008; citado 2012 julio 1]. ECM novetko international inc; [aprox. 1 pagina]. Disponible en:
<http://innovets.com/Sexado%20Fetal.pdf>
27. **SEDAI de Citometría** [Internet]. Departamento de Medicina. Universidad de Lleida. España [actualizado 2002 Ene; citado 2012 Jul 1]. Servicio Departamental de Ayuda a la Investigación; [aprox. 1 pagina]. Disponible en:
<http://web.udl.es/dept/medicina/sedaicmf/sedai/intro.htm>
28. **Sexado de Esperma** [Internet]. Coyoacán México: [actualizado 2008; citado 2012 julio 1]. Colegio Anglo Mexicano De Coyoacán; [aprox. 1 pagina]. Disponible en:
<http://www.acmor.org.mx/cuamweb/reportescongre>



so/2010/biologia/213-%20ColegAnglMexCoyoac-%20Sexado%20%20de%20esperma.pdf

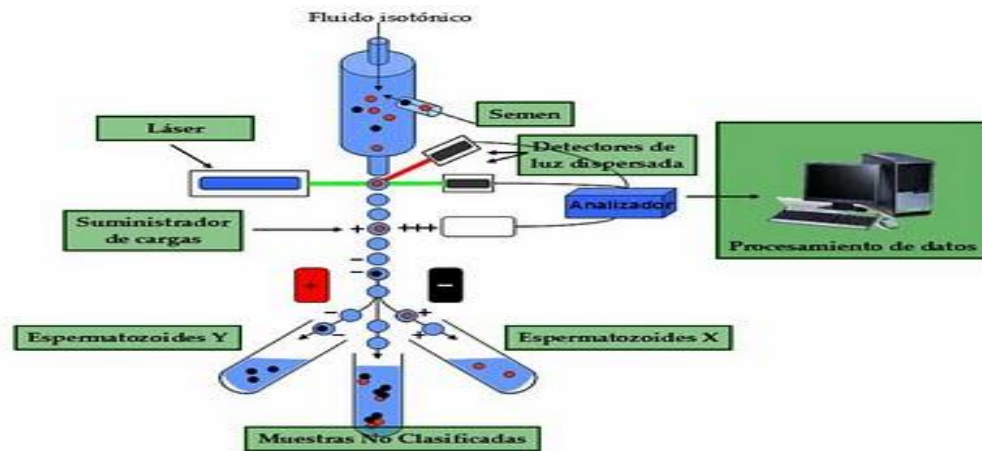
29. **SOLARTE PORTILLA C, ROSERO GALINDO C.** Aplicaciones Actuales y Potenciales de Genética en producción Animal [Internet]. R. Tendencias Vol. IX Nº 2, 2008 [Internet]. 2011 Di: [citado 1 jun 2012]; 109-129 (17): [aprox. 1 p.]. Disponible en: <http://promegalac.udenar.edu.co/wp-content/uploads/2010/05/APLICACIONES-ACTUALES-Y-POTENCIALES-DE-GENETICA-EN-PRODUCCION-ANIMAL.pdf>
30. **THEDY DIEGO X.** Determinación del sexo de bovinos [Internet]. Porto Alegre: Universidad Federal del Sur de Rio Grande Facultad de Veterinaria; 2012 [citado 1 Julio 2012]. Disponible en: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/39013/000792152.pdf?sequence=1>
31. **Unicen.** Herencia del Sexo. Argentina: Unicen; 2012 [citado 1 Julio 2012]. Disponible en: http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Mejora_genetica/Documentos/3-%20Genetica%20del%20Sexo.pdf



32. **Universidad de Córdoba** [Internet]. España: INIA Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria; 2012 [actualizado 2012 Marzo; citado 2012 Julio 1]. INIA- Reproducción Animal y Conservación Recursos Zoogeneticos; [aprox 1 pantalla]. Disponible en: http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/09_12_12_6__FIV_Cordoba_2012.pdf
33. **OLIVERA ANGELINO, J.** Manual de evaluación de semen en bovinos. Tesis presentada a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, Región Veracruz. 2009. Disponible en <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOS e%20NICOLaS%20ANGELINO%20OLIVERA.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Citómetro de flujo para el sexado de semen.



Fuente: Últimas noticias ciencia [Internet]

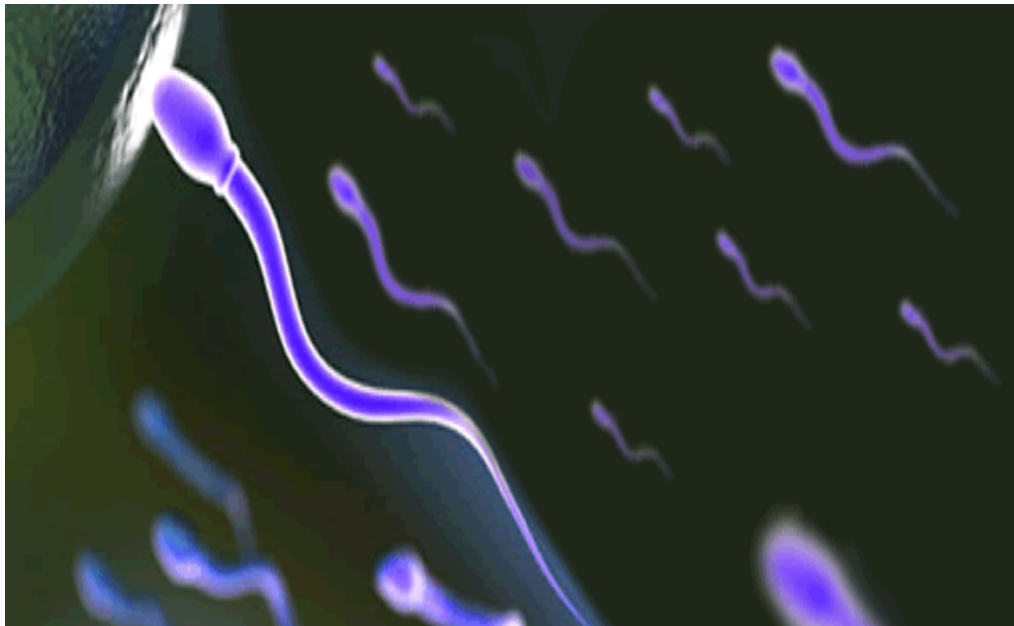
<http://www.noticiascientificas.info/2011/03/citometria-de-flujo.html>

Anexo 2. Sistema computarizado de observación y clasificación de semen



Fuente: ABS Uruguay <http://www.abs.com.uy/>

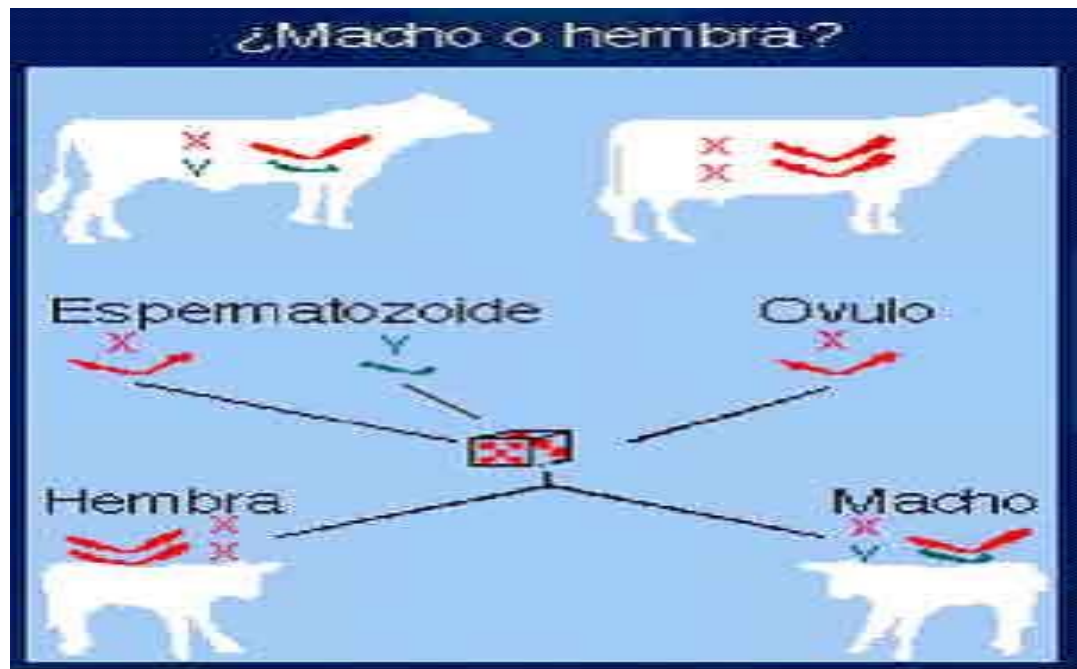
Anexo 3. Espermatozoides coloreados con (hoechts 33342) emitiendo fluorescencia a la luz del laser.



Fuente: Blasina y Asociados.

<http://blasinayasociados.com/conexion-tecnologica/el-semen-sexado-llego-para-quedarse/>

Anexo 4. Grafica que caracteriza los cromosomas sexuales de cada especie



Fuente: HOLSTEIN Madison. <http://www.holstein.com.co>



Anexo 5. Factores Importantes a considerar en la evaluación del semen sexado

Factor Principal	semen sexado	semen Convencional
Proporción de Crías	Mas baja	Mas alta ↗
Costo de la dosis de Semen	Mas bajo ↗	Mas alto
Porcentaje de Concepción (TC)	Mas alto ↗	Mas bajo
Incidencia de distocia	Mas alta	Mas baja ↗

Fuente: Cabrera V, Universidad de Wisconsin- Madison.
http://www.reproduccionanimal.com.mx/AISS_valor%20%20Semen%20sexado%20Ind%20Lechera.pdf



Anexo 6. Variables Reproductivas de Base para evaluar el Semen Sexado

Programa de Reproducción de Vaquillas	Tasa de concepción (%)	Crías Hembra (%)
semen Convencional	56.0	46.7
semen sexado	44.8	89.0

Fuente: Cabrera V, Universidad de Wisconsin-Madison
http://www.reproduccionanimal.com.mx/AISS_valor%20%20Semen%20sexado%20Ind%20Lechera.pdf

Anexo 7. Protocolos para la inseminación artificial a tiempo fijo.



Fuente: [en línea]. Murguía Ana MVZ, M.Sc.

<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/manejo/articulos/vida-productiva-vaca-lechera-t4376/124-p0.htm>

Anexo 8. Esquema de la fecundación in vitro.



Fuente [en línea].

http://fecundacioninvitroanimales.blogspot.com/2010_04_01_archive.html